

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P. DE MEDICINA VETERIANARIA**

**“SEROPREVALENCIA DE *Encephalitozoon cuniculi* EN  
CONEJOS DESTINADOS COMO MASCOTAS EN LA  
PROVINCIA DE LIMA”**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de**

**Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Vicente Jesús Chilón Cornejo**

**Lima – Perú**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que colaboraron con la realización de este trabajo, muchas gracias.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BLIOGRÁFICA	3
2.1 TAXONOMIA Y FILOGENIA	3
2.2 GENOMA	5
2.3 ESTRUCTURA Y CICLO DE VIDA	6
2.3.1 Estructura	6
2.3.2 Ciclo de vida	8
2.3.2.1 Merogonia	11
2.3.2.2 Esporogonia	11
2.4 INFECCIÓN Y ENFERMEDAD	12
2.4.1 Enfermedad en conejos	12
2.4.1.1 Manifestaciones neurológicas de la enfermedad	12
2.4.1.2 Manifestaciones renales de la enfermedad	14
2.4.1.3 Manifestaciones oculares de la enfermedad	15
2.4.2 Enfermedad en humanos	16
2.5 PERSISTENCIA AMBIENTAL	17
2.6 EPIDEMIOLOGIA	18
2.7 CONTROL Y MANEJO	19
2.7.1 Diagnóstico diferencial	19
2.7.2 Procedimientos diagnósticos	21
2.7.2.1 Serología	22
2.7.2.2 Detección de esporas en los tejidos	24
2.7.2.3 Detección de esporas en los fluidos corporales	24
2.7.2.4 Análisis moleculares	25

2.8	TERAPIA Y CONTROL	25
III.	MATERIALES Y METODOS	29
3.1	LUGAR Y TIEMPO DEL ESTUDIO	29
3.2	METODOLOGIA DE TRABAJO	30
3.2.1	Obtención de muestras	30
3.2.2	Procesamiento de las muestras	30
3.3	ANALISIS ESTADISTICO	30
IV.	RESULTADOS	32
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIÓN	39
VII.	BIBLIOGRAFIA	40

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* en conejos destinados como mascotas. Se evaluaron las muestras serológicas de 76 conejos clínicamente sanos provenientes de 7 granjas de la provincia de Lima. Las muestras se procesaron utilizando un kit de ELISA. Anticuerpos contra el *Encephalitozoon cuniculi* fueron encontrados en el 43/76 (56.6%) de la muestras analizadas. El análisis de regresión logística de los resultados mostro que la edad en meses (9 meses) se asociaba al riesgo que un conejo sea positivo a la prueba serológica ( $P<0.05$ ). Los resultados demostraron la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* con una alta prevalencia en conejos destinados como mascota en la provincia de Lima.

**Palabras claves:** Conejos, *Encephalitozoon cuniculi*, ELISA, Lima, anticuerpos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. Serum samples of 76 clinically healthy rabbits from 7 farms in the province of Lima were evaluated. The samples were processed using an ELISA kit. Antibodies anti-*Encephalitozoon cuniculi* were found in 43/76 (56.6%) of the analyzed samples. The logistic regression showed that the age in months (9 months) was associated with the risk that a rabbit is positive to the serological test ( $P < 0.05$ ). The results showed the presence of antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* with a high prevalence in pet rabbits in the province of Lima.

**Keywords:** Pet rabbits, *Encephalitozoon cuniculi*, ELISA, antibodies, Lima.

## **Lista de figuras:**

- Figura 1:** Estructura interna del microsporidio **Pág. 7**
- Figura 2:** Microfotografía de microscopia electrónica presentando una sección transversal de una espora de *Encephalitozoon. Cuniculi*. **Pág. 8**
- Figura 3:** Germinación de la espora durante la eversión del tubo polar. **Pág. 10**
- Figura 4:** Representación esquemática del ciclo asexual de la espora del *Encephalitozoon cuniculi* **Pág. 12**
- Figura 5:** Conejo con signos de enfermedad vestibular debido a infección cerebral por *Encephalitozoon cuniculi*. **Pág. 13**
- Figura 6:** Apariencia típica del riñón de un conejo infectado con *Encephalitozoon cuniculi*. **Pág. 14**
- Figura 7:** Escaldadura por orina en un conejo, secundaria a incontinencia urinaria asociada a infección por *Encephalitozoon cuniculi*. **Pág. 15**
- Figura 8:** Prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi*. **Pág. 31**

### **Lista de tablas:**

**Tabla 1:** hospedero y distribución geográfica de las cepas del *Encephalitozoon cuniculi*. **Pág. 19**

**Tabla 2:** Prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos determinado por ensayo serológico **Pág. 23**

**Tabla 3:** Valores de regresión logística. **Pág. 33**

**Tabla 4:** Frecuencia de animales positivos según sexo y edad **Pág. 34**

**Tabla 5:** Frecuencia de animales positivos según raza. **Pág. 34**

**Tabla 6:** Frecuencia de animales positivos según edad. **Pág. 35**



## I. INTRODUCCIÓN

La encephalitozoonosis es una enfermedad que afecta a un gran número de hospedadores, incluyendo al humano. No obstante, afecta en mayor proporción a conejos. Es ocasionada por el *Encephalitozoon cuniculi*, un microsporidio que pertenece al Phylum Microsporidia. Los microsporidios son microorganismos intracelulares obligados, que están considerados como patógenos emergentes, pues varias especies que infectan a humanos también han sido identificadas en animales, sugiriendo una potencial transmisión zoonótica.

Los microsporidios son organismos eucariotas que también muestran características moleculares y citológicas de procariotas. Esto incluye el tamaño y organización del genoma, carencia de mitocondrias y aparato de Golgi (Mathis, 2000). Los microsporidios tienen los genomas más pequeños entre los genomas eucariotas reportados y este Phylum ha sido recientemente reclasificado dentro del reino Fungi dada sus características genéticas y estructurales (Keeling *et al.*, 2000).

Aproximadamente 1200 especies de microsporidia han sido identificadas en los últimos años y la mayoría de ellas infectan invertebrados y peces (Weiss *et al.*, 1999). Éstas se encuentran clasificadas en 143 géneros, donde al menos

14 pueden infectar humanos. Los microsporidios tienen un amplio rango de hospedadores, desde invertebrados (especialmente insectos) hasta vertebrados (Mathis, 2005).

El diagnóstico del *Encephalitozoon cuniculi* es difícil, sobre todo en conejos, debido a que muchos animales están infectados de forma subclínica. Sin embargo, cuando el cuadro clínico se presenta, la enfermedad se caracteriza por ocasionar signos neurológicos, falla renal crónica y/o la uveítis facoclastica. Por otro lado, la seroprevalencia es alta a pesar de la ausencia de manifestaciones clínicas, lo que sugiere que la presencia de anticuerpos en el suero es indicativo de infección, pero no de enfermedad clínica.

Hoy en día el *Encephalitozoon cuniculi* ha adquirido gran importancia, debido a que es considerado como un patógeno oportunista en humanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y otras alteraciones del sistema inmune. La fuente de la infección en humanos aún no está esclarecida, pero se considera principalmente al conejo como reservorio para la infección en humanos. Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* en conejos clínicamente sanos, utilizando una prueba comercial de ELISA.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 TAXONOMIA Y FILOGENIA

El *Encephalitozoon cuniculi* ha sido recientemente clasificado dentro del reino Fungi, Phylum Microsporidia (Cavalier-Smith, 2004). La taxonomía y clasificación de las diferentes especies de microsporidios se ha establecido sobre la base de sus hospedadores naturales, características ultraestructurales, tamaño y morfología de las diferentes etapas de desarrollo, ciclo de vida, la configuración de los núcleos en las esporas, presencia de uno o dos núcleos (monocarión o diplocarion), la interfaz de hospedador-parásito, el número de enrollamientos del aparato tubular de extrusión de las esporas y especificidad de la célula hospedadora (Weber *et al.*, 1994; Didier *et al.*, 2000).

Las investigaciones sobre la biología básica han revelado muchas características excepcionales de los microsporidios. Aunque son verdaderos eucariotas (poseen un núcleo típico eucariota rodeado de su membrana nuclear, sistema de endomembranas y citoesqueleto), también muestran características moleculares y citológicas que recuerdan a los procariotas, como el tamaño del genoma (que está en el intervalo de la bacterias), la ausencia de

mitocondrias reconocibles, ausencia de peroxisomas y presencia de un aparato de Golgi atípico (Didier *et al.*, 2000).

Debido a sus características procariotas los microsporidios fueron catalogados inicialmente dentro del reino Protista, subreino Protozoa, (Didier *et al.*, 2004). En este sentido, los microsporidios fueron primero clasificados como *Archezoa*, junto con otros organismos amitocondriados, entre ellos *Giardia*, *Trichomonas* y *Entamoeba*. Sin embargo, la secuencia del genoma de *Encephalitozoon cuniculi* reveló que contiene genes relacionados con algunas funciones mitocondriales, lo que implica que los microsporidios han conservado orgánulos pequeños con membranas dobles, derivados de mitocondrias denominados mitosomas (Katinka *et al.*, 2001; Vivares *et al.*, 2002).

Estos mitosomas se pudieron demostrar utilizando anticuerpos contra una proteína mitocondrial específica. Esta se denomina “proteína de choque de calor HSP70” (Sorvillo y Kerndt, 1995). Los genes que la codifican se han identificado en los microsporidios *Nosema locustae*, *Variomorfa necatrix*, *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem*. El hallazgo de estos genes sugiere que los microsporidios pueden haber evolucionado degenerativamente de formas superiores (Germot *et al.*, 1997; Hirt *et al.*, 1997).

Los árboles filogenéticos contruidos sobre la base de los genes que secuencian diversos tipos de proteínas sugirieron que los microsporidios estaban íntimamente relacionados con los hongos (Edlind *et al.*, 1996). Los microsporidios comparten con los hongos: 1) la presencia de quitina (polisacárido que conforma la pared celular) y trehalosa (disacárido que tiene funciones de reserva y protección), 2) similitudes entre los ciclos celulares y 3) la organización de ciertos genes (Mathis *et al.*, 2005), por ello, los microsporidios hoy son considerados dentro del reino Fungi.

## 2.3 GENOMA

El genoma de los microsporidios es relativamente pequeño, en comparación con el de otros eucariontes. El genoma del *Encephalitozoon cuniculi* es solo de 2.9 mega pares de bases (Mbp) en 11 pares de cromosomas, con un estimado de 1997 genes codificadores de proteínas (Biderre *et al.*, 1999; Katinka *et al.*, 2001). El genoma del *Encephalitozoon intestinalis* es aún más pequeño, con 2.3 Mbp (Biderre *et al.*, 1999), en comparación con el *Escherichia coli* con 4000 genes (4.6 Mbp), la *Drosophila melanogaster* con 12000 genes (140 Mbp) y el *Homo sapiens* con 25000 genes (3300 Mbp) (Clark, 2010).

El *Encephalitozoon cuniculi* posee una compactación genómica que se refleja en un espacio intergénico reducido. Este es un embalaje hermético de la información genética en los cromosomas, con características como: ausencia de intrones, número bajo de secuencias repetitivas y muchos genes de copia única, acortamiento de los genes, presencia de secuencias no codificantes y pérdida de información genética con respecto a ciertas vías metabólicas, lo que parece ser irrelevante en la vida del microorganismo (Mathis 2000; Katinka *et al.*, 2001). Tales características demuestran porque tiene una fuerte dependencia de los metabolitos de su hospedador (Didier *et al.*, 2004).

Debido a estas pérdidas genéticas y funcionales importantes han dado como resultado uno de los genomas eucariontes más pequeños descritos a la fecha. Por ello, la clasificación de los microsporidios entre los hongos podría tener implicaciones en el desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas (Mathis *et al.*, 2005).

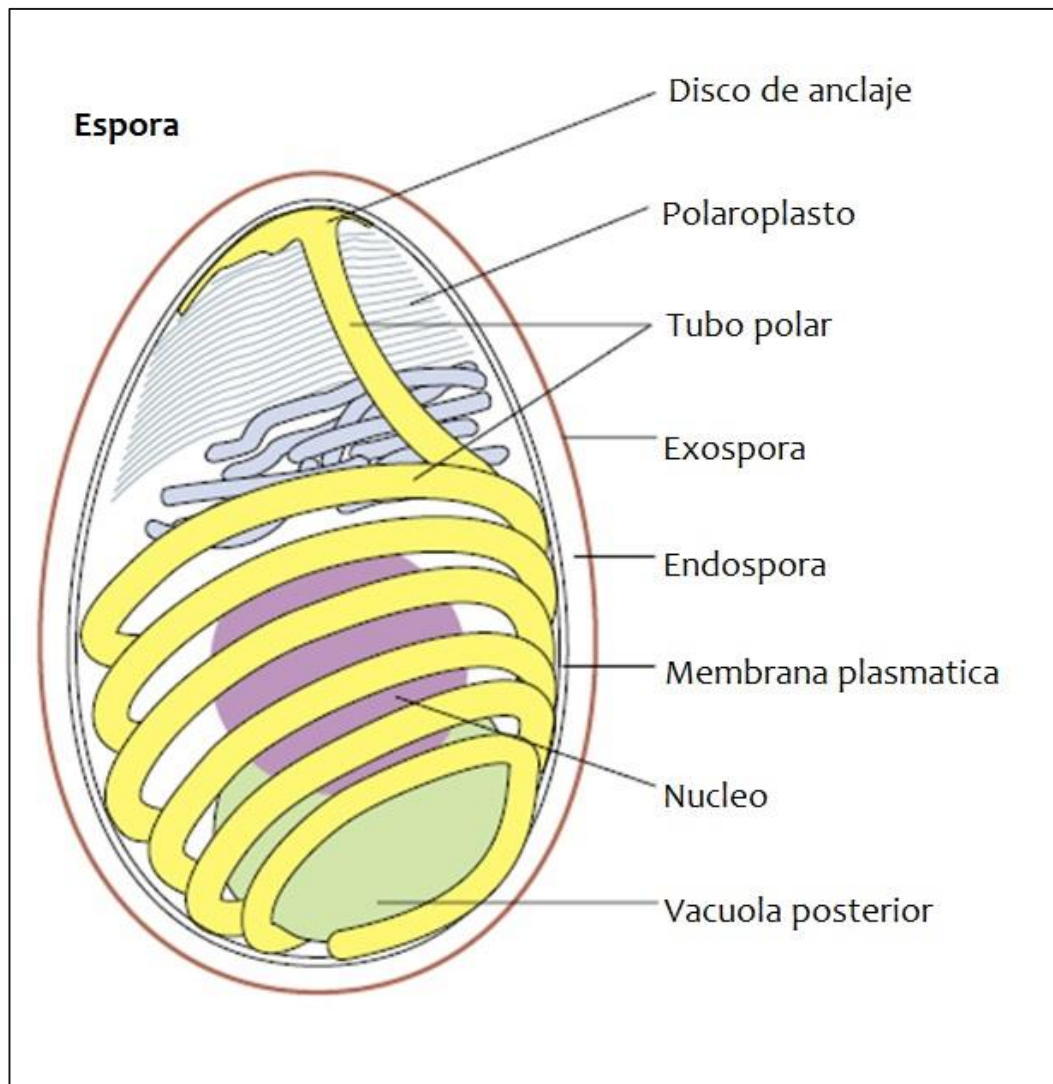
## 2.4 ESTRUCTURA Y CICLO DE VIDA

### 2.3.1 Estructura

La espora es el estadio infeccioso del *Encephalitozoon cuniculi*. Las esporas son pequeñas, de forma ovalada y miden aproximadamente entre 1.0-1.5 x 2.0-2.5  $\mu\text{m}$ . (Franzen y Muller, 2001). Presentan ribosomas muy parecidos a los de los procariontes. Por otro lado, tienen características únicas, como la ausencia peroxisomas, centriolos y mitocondrias. En su lugar presentan unos orgánulos llamados mitosomas, que son considerados mitocondrias reducidas (Bigliardi *et al.*, 2001).

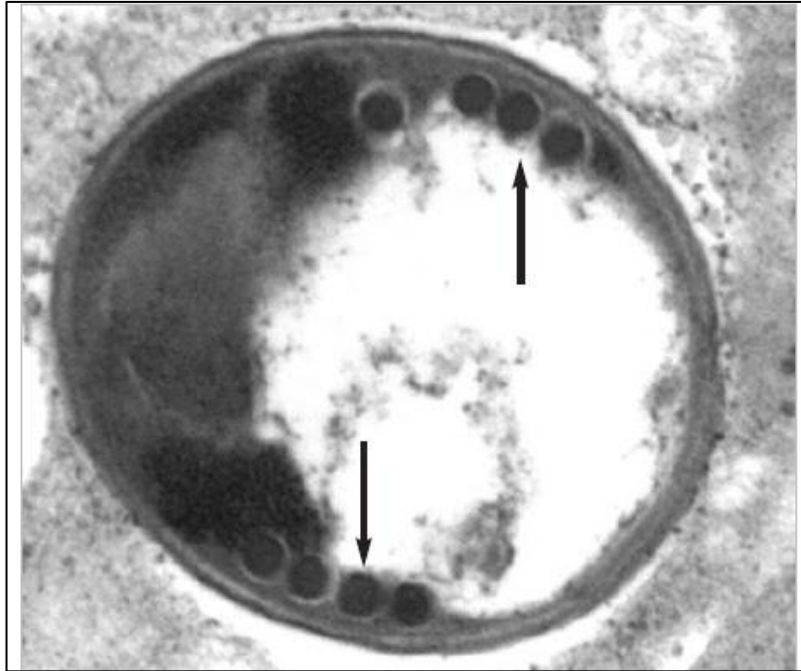
Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* son el único estadio infeccioso capaz de sobrevivir fuera de la célula hospedadora (Didier *et al.*, 2000). Estas son altamente resistentes a condiciones ambientales adversas y pueden permanecer viables durante varios años. Esto es debido a que están rodeadas de una pared gruesa formada por tres capas: 1) una capa externa electrón-densa, compuesta por glicoproteínas llamada exospora, 2) una capa interna electrón-lúcida, compuesta por quitina llamada endospora y 3) una membrana plasmática que encierra el esporoplasma o citoplasma de la espora, que es el material infeccioso del parásito (Kelling y Fast, 2002).

El *Encephalitozoon cuniculi* posee esporas con un citoplasma o esporoplasma, que contiene varias estructuras únicas. Este citoplasma contiene un solo núcleo, una vacuola distintiva en la parte posterior y un disco de anclaje en ápice de la espora. También presenta el polaroplasto, el cual está formado en su región anterior por el polaroplasto lamelar, que consiste en una pila de membranas aplanadas dispuestos perpendicularmente al tubo polar, y en su región posterior por el polaroplasto vesicular, que consiste en unas estructuras tubulares situados en la región media de la espora (Bigliardi *et al.*, 1996). (Figura 1).



**Figura 1:** Estructura interna del microsporidio (Franzen, 2004).

La vacuola posterior es un orgánulo unido a la membrana situada en la parte posterior de la espora y, junto con el polaroplasto, se considera como parte del aparato de extrusión (Cali *et al.*, 1993). Por su lado, el filamento o tubo polar es un tubo hueco, que surge desde el disco de anclaje (ubicado en el ápice de la espora) y se enrolla dentro de la parte media a la posterior de la espora. El número de vueltas (o enrollamientos) del tubo polar tiene importancia taxonómica. Por ejemplo, tiene de seis a diez vueltas en una fila doble en los géneros *Enterocytozoon* y *Brachiola* y de cinco a once vueltas en una sola fila en los géneros *Encephalitozoon*, *Trachypleistophora* y *Vittaforma* (Snowden *et al.*, 1998). (Figura 2).



**Figura 2:** Microfotografía de microscopía electrónica presentando una sección transversal de una espora de *Encephalitozoon cuniculi*. Las flechas señalan los enrollamientos del tubo polar (Jordan *et al.*, 2006).

El núcleo puede existir como monocarion, el cual consiste en un solo núcleo, en los microsporidios *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora* y *Encephalitozoon*. No obstante, el núcleo puede existir como diplocarion, que consta de dos núcleos que funcionan como una sola unidad, en *Nosema*, *Vittaforma* y *Thelohania*, (Sprague *et al.*, 1992).

### 2.3.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida del *Encephalitozoon cuniculi* se inicia cuando la espora penetra la célula hospedadora. Esta acción la realiza a través de la extrusión y penetración del tubo polar (Weiss, 2001). Los hospedadores se infectan por ingestión y/o inhalación de esporas o por transmisión transplacentaria. Todo el ciclo del microsporidio tarda en completarse de 3 a 5 semanas (Richardson, 2000).

El ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi* involucra diversos eventos. La germinación de las esporas se inicia con un desencadenante ambiental, que varía entre las diferentes especies, lo que depende de su hábitat (Undeen y



Epsky, 1990). Las esporas pueden germinar *in vitro* mediante diversos estímulos físicos y químicos, incluyendo alteraciones en el pH, deshidratación seguida de rehidratación, condiciones hiperosmolares, presencia de aniones o cationes, exposición a luz ultravioleta o peróxidos.

Cuando una espora se induce a germinar se puede observar señales específicas. La primera señal de la germinación es una hinchazón general de la espora y una inflamación específica del polaroplasto y la vacuola posterior (Lom y Vavra, 1963). Este es el resultado de un aumento en la presión osmótica dentro de la espora (Undeen y Frixione, 1990). Las esporas presentan acuaporinas que transportan específicamente agua a través de la membrana del esporoplasma (Frixione *et al.*, 1997), lo que podría explicar la afluencia de agua dentro de la espora y por lo tanto el aumento de la presión osmótica.

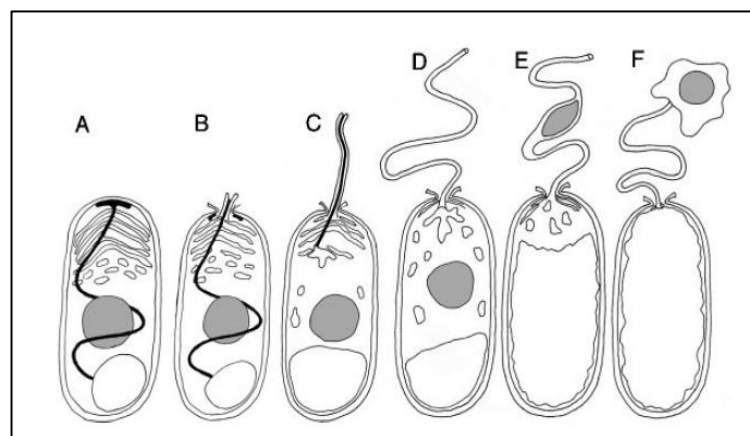
Las esporas de los microsporidios, al igual que los hongos, necesitan una fuente de hidratos de carbono para su desarrollo. El disacárido trehalosa es uno de ellos (Arguelles, 2000) y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (Undeen *et al.*, 1987). Se ha sugerido que durante la activación de las esporas la trehalosa se degrada a sus dos moléculas de glucosa, dando como resultado un aumento efectivo de la cantidad de moléculas solubles dentro de la espora. Esto conduciría a la afluencia de grandes cantidades de agua y al aumento de la presión osmótica (Undeen y Van der Meer, 1994). No obstante, no parece ser la única causa de afluencia de agua.

La germinación de la espora implica un gran número de condiciones cambiantes. Por lo tanto, los niveles de trehalosa no serían la única causa del aumento de la presión osmótica interna. En este sentido, se sabe que los niveles de trehalosa en una especie relacionada de microsporidio (*Nosema apis*) no cambian durante la germinación (De graaf *et al.*, 1993), lo que sugiere que existen otras causas de afluencia de agua. Los modelos alternativos señalan a la concentración intracelular de iones de calcio como causa de la

afluencia de agua (Keohane y Weiss, 1998) y un posible papel de la calmodulina en el proceso (Weidner *et al.*, 1999).

El aumento y acumulación de presión son eventos importantes durante la activación de la espora de los microsporidios. El origen de ambos podría estar en la ruptura de la membrana durante la activación de las esporas, que es cuando se liberan iones de calcio, los que inducirían la afluencia de agua. La liberación de este calcio se da a partir del sistema de endomembrana en el esporoplasma. No obstante, cualquiera que sea la causa principal, la presión osmótica de la espora se acumula y esta presión parece ser la fuerza motriz de los acontecimientos posteriores de la germinación (Keohane y Weiss, 1998).

La presión interna de la espora del microsporidio, que precede a los acontecimientos posteriores de la germinación, es la responsable de la salida del esporoplasma de la espora. La presión interna y la ruptura de la membrana esporoplasmica culminará con la ruptura del disco de anclaje y la descarga del filamento polar por eversión. La eversión comienza en el vértice de la espora en su región más delgada y se asemeja a invertir el dedo de un guante de adentro hacia afuera. Una vez que el tubo polar está completamente descargado, la continua presión dentro de la espora (causada probablemente por la hinchazón de la vacuola posterior) obliga al esporoplasma a salir a través del tubo polar (Franzen y Muller, 2001). (Figura 3).



**Figura 3:** Germinación de la espora durante la eversión del tubo polar. **A.** Espora durmiente presentando el filamento polar (negro), núcleo (gris), polaroplasto y vacuola posterior. **B.** Hinchazón del polaroplasto y la vacuola posterior, ruptura del disco de anclaje y el tubo polar comienza a emerger evertiéndose sobre sí mismo. **C.** El filamento polar continúa evertiéndose. **D.** y **E.** Una vez que el tubo polar está completamente evertido, el esporoplasma es forzado dentro y a través del tubo polar. **F.** El esporoplasma emerge desde el tubo polar confinado por su nueva membrana (Kelling y Fast, 2002).

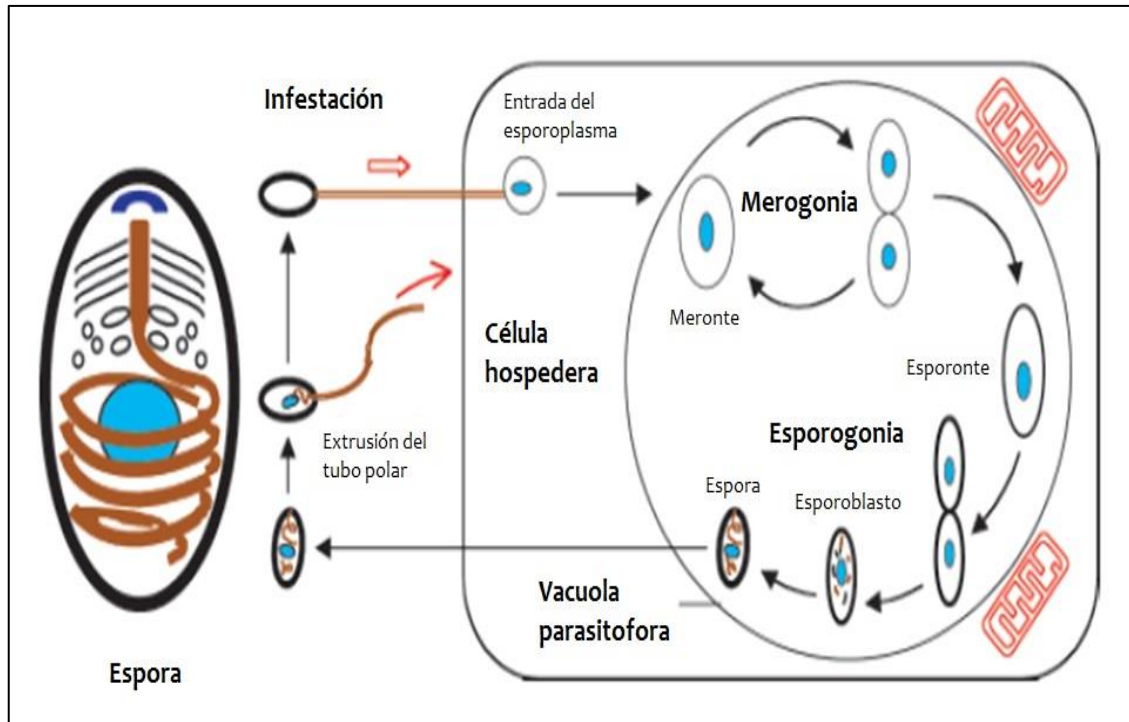
Hay dos fases distintas en el desarrollo de microsporidios. Una de ellas es la fase proliferativa, denominada también merogonia y es la responsable del aumento masivo en número dentro de la célula hospedadora. Otra fase es la de maduración, denominada esporogonia, donde los esporontes producen esporoblastos, los que madurarán a esporas.

#### **2.3.2.1 Merogonia**

La fase proliferativa (merogonia) se produce una vez que el esporoplasma entra en la célula hospedadora. Las células proliferativas, llamadas merontes, son células simples, redondeadas, irregulares, con poco citoplasma diferenciado y encerradas por una membrana plasmática (Vivares y Metenier, 2001). Tienen una región nuclear grande con uno o dos núcleos dependiendo de la especie. Las células proliferativas se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped (*Nosema*, *Enterocytozoon*) y en una vacuola parasitófora en el caso del *Encephalitozoon sp.* La división se produce por fisión binaria en el caso del *Encephalitozoon*, *Nosema* y *Vittaforma*. (Franzen y Muller, 2001).

#### **2.3.2.2 Esporogonia**

Esta es la fase de maduración que implica esencialmente la conversión del meronte en un esporonte. Esta se caracteriza por la formación de una capa superficial densa y engrosada, que se desarrolla más tarde en la exospora de la espora. Los esporontes se multiplican por fisión binaria y se dividen en esporoblastos. Los esporoblastos finalmente se convertirán en esporas maduras (Franzen y Muller, 2001) y sintetizarán los organulos de las esporas. (Figura 4).



**Figura 4:** Representación esquemática del ciclo asexual de la espora del *Encephalitozoon cuniculi*. El tubo polar está enrollado dentro de la espora protegido por una compleja pared celular. En la región anterior, el disco de anclaje y la pila de membranas denominado polaroplasto se muestran después de su extrusión, el tubo polar asegura la entrada del esporoplasma dentro de una nueva célula huésped. En el *Encephalitozoon. cuniculi*, todas las etapas (merogonia y esporogonia) están confinadas dentro de una vacuola, la multiplicación celular se produce por fisión binaria y cada esporonte se divide en dos esporoblastos. La esporogonia siempre implica la formación de la pared celular y diferentes elementos del aparato de invasión de la espora (Vivarrès y Méténier, 2001).

## 2.5 INFECCION Y ENFERMEDAD

### 2.4.1 Enfermedad en conejos

#### 2.4.1.1 Manifestaciones neurológicas de la enfermedad

Los signos clínicos pueden variar de animal en animal. La mayoría de los animales infectados por *Encephalitozoon cuniculi* son asintomáticos. Pero, cuando se observan signos clínicos, por lo general son de tipo neurológico (Künzel y Joachim, 2010). La enfermedad pueden desarrollarse en conejos de cualquier edad y la aparición de la enfermedad puede ser repentina y fatal. En la mayoría de los casos la aparición de los signos clínicos es súbita y con

frecuencia luego de un evento estresante en la vida del conejo (Jordan *et al.*, 2006).

Los conejos con encefalitozoonosis presentan con mayor frecuencia signos de tipo neurológicos. El signo neurológico con mayor frecuencia observado es la enfermedad vestibular (Kunstýr y Naumann, 1983; Harcourt-Brown y Holloway, 2003). Los signos de la enfermedad vestibular pueden variar en severidad, desde una inclinación o giro menor de la cabeza, ataxia, caminata en círculos, nistagmo y movimientos de rotación alrededor del eje longitudinal del cuerpo. Otros signos neurológicos observados son las convulsiones, parálisis, hemiparesia, temblores de la cabeza, cambios en el comportamiento (agresión, automutilación) y disfunción de los nervios craneales (Harcourt-Brown y Holloway, 2003; Jordan *et al.*, 2006). (Figura 5).



**Figura 5:** Conejo con signos de enfermedad vestibular debido a infección cerebral por *Encephalitozoon cuniculi* (Mathis *et al.*, 2005)

El examen histopatológico puede ayudar a confirmar el diagnóstico clínico. En el examen de tejido cerebral se encuentra una meningoencefalitis con manguitos perivasculares, granulomas focales de células gliales y linfocitos. En algunos casos, también se pueden observar mineralizaciones multifocales (Nast *et al.*, 1996). Generalmente, las lesiones cerebrales se observan (por lo menos) 8 semanas después de que los anticuerpos se detecten por primera vez o aproximadamente 3 meses después de la infección (Jordan *et al.*, 2006).

#### 2.4.1.2 Manifestaciones renales de la enfermedad

El *Encephalitozoon cuniculi* puede ocasionar alteraciones renales características, las cuales se pueden observar en los hallazgos postmortem. Los hallazgos macroscópicos de la infección renal incluyen presencia de cicatrices, superficie irregular y depresiones en los riñones, incluso en conejos que han muerto o han sido sacrificados por razones ajenas a la encefalitozoonosis. Por su lado, el examen histopatológico revela nefritis intersticial granulomatosa con infiltración de macrófagos. Además, es característico observar degeneración de los túbulos renales (Redrobe, 2000). (Figura 6).



**Figura 6:** Apariencia típica del riñón de un conejo infectado con *Encephalitozoon cuniculi* con una superficie irregular y llena de cicatrices, característica de lesiones antiguas. (Harcourt-Brown, 2004).

La encefalitozoonosis ocasiona alteraciones de la bioquímica sanguínea. Por ejemplo, se puede observar una elevación leve de la urea en sangre, con niveles de alrededor de 150 mg/dl. Además, los niveles de potasio sérico pueden elevarse, así como los de creatinina, la que puede alcanzar concentraciones de 6 mg/dl. Por otro lado, algunos animales presentan valores bajos de hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos (Harcourt-Brown y Holloway, 2003).

La pérdida de peso es una característica de la insuficiencia renal crónica. Algunos conejos con poliuria y polidipsia pueden sufrir de incontinencia urinaria. (Figura 7).



**Figura 7:** Escaldadura por orina en un conejo, secundaria a incontinencia urinaria asociada a infección por *Encephalitozoon cuniculi*. (Keeble y Shaw, 2006).

#### **2.4.1.3 Manifestaciones oculares de la enfermedad**

Enfermedad ocular es común en conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. Algunos investigadores creen que las esporas de *Encephalitozoon*

*cuniculi* infectan el cristalino durante el desarrollo en el útero (transmisión vertical), cuando la cápsula del cristalino es delgada o está ausente (Wolfer *et al.*, 1993). La infección del cristalino resulta en una uveítis facoclástica, otra condición que también pueden ser causados por la pasteurelosis. La ruptura de la cápsula anterior del cristalino, lleva a una uveítis granulomatosa zonal, por la liberación del material del cristalino en la cámara anterior, cerca de la ruptura de la cápsula del cristalino. La severa inflamación del globo ocular puede conducir a la pérdida de la visión. Las cataratas pueden ocurrir como resultado de la disrupción de las fibras del cristalino, aunque la visión por lo general se mantiene. (Harcourt-Brown y Harcourt-Brown, 2002).

#### **2.4.2 Enfermedad en humanos**

La infección por especies de *Encephalitozoon* se da en humanos, sobre todo aquellos con un sistema inmune deficiente. Las especies de *Encephalitozoon* que se pueden encontrar en humanos son: *E. intestinalis*, *E. hellem* y *E. cuniculi*. Estas especies se pueden diagnosticar por métodos inmunológicos y/o moleculares. La enfermedad se da con frecuencia en pacientes infectados por VIH, personas con órganos transplantados o con linfocitopenia T selectiva CD4+ idiopática. Estas infecciones están clínicamente asociadas con diarrea, rinosinusitis, miositis, neumonía, peritonitis, queratoconjuntivitis, hepatitis, nefritis y encefalitis (Weber *et al.*, 2000).

La duración de los signos clínicos en personas infectadas puede ser muy variable. Probablemente, esto dependa del estado inmunitario del individuo en el momento de la infección. Por ejemplo, en las personas que ya tienen inmunodepresión en el momento de la infección inicial con *Encephalitozoon* se observa que no son capaces de generar las respuestas inmunes protectoras (Didier, 1998). Por otro lado, a pesar que es poco lo que se conoce sobre la prevalencia y el significado clínico de la infección en individuos inmunocompetentes (Franzen y Muller, 2001), se sabe que estas son capaces



de generar respuestas inmunes, que pueden persistir durante algún tiempo (Didier, 1998).

## 2.5 PERSISTENCIA AMBIENTAL

Los microsporidios tienen una gran capacidad de contaminar el medio ambiente. Existe una gama amplia de hospedadores que pueden infectarse con microsporidios, entre los que se incluye insectos y miembros de todas las clases de vertebrados. Posteriormente, estos expulsarán esporas, contaminando de esta manera el medio ambiente. Por otro lado, la pared de la espora, compuesta por quitina, permite cierta protección frente a condiciones ambientales adversas. Por ello, el gran número de esporas que pueden llegar al ambiente y la protección natural que poseen, confieren a los microsporidios una gran capacidad de contaminación.

La capacidad de resistencia de los microsporidios a temperaturas variables se ha probado en condiciones experimentales. La incubación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi*, en un sistema de cultivo de tejidos, a 22 °C durante 16 días y a 4 °C durante 98 días, demostró que al menos algunas esporas permanecieron infecciosas (Waller, 1979). Es más, esporas que se secaron y luego se incubaron a 22 °C, a una humedad relativa entre 0-2 % durante 28 días, permanecieron infecciosas (Shadduck y Polley, 1978).

Muchas de las esporas de microsporidios cultivadas resisten condiciones desfavorables de temperatura y pH. Por ejemplo, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* y *Encephalitozoon cuniculi* son capaces de infectar un cultivo de células hospedadoras después de la incubación en agua a temperaturas que van de 10 a 30 °C durante varias semanas a meses (Li *et al.*, 2003). También la congelación, descongelación e incubación en agua destilada no destruye todas las esporas. Estas son capaces de sobrevivir (al menos 24 horas) después de la incubación a pH 4 y pH 9 (Shadduck y Polley, 1978). Es más, muchas de las esporas pueden ocasionar infecciones letales

después de una incubación en agua destilada a 4 °C durante 2 años o después de someterlas a temperaturas de congelación (- 12 y -24 °C) durante 24 horas (Koudela *et al.*, 1999).

Los hallazgos, arriba mencionados, indican que los microsporidios tienen el potencial de persistir después de la incubación en un medio de cultivo tisular. Es decir, son capaces de persistir en agua dulce, agua salada o después de deshidratación durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente. Por lo tanto, plantean un problema de salud, con riesgo de transmisión a hospedadores susceptibles.

## **2.6 EPIDEMIOLOGIA**

La prevalencia del *Encephalitozoon cuniculi* es usualmente alta en su principal hospedador, el conejo. Sin embargo, es capaz de infectar a otros mamíferos incluyendo roedores, lobos, caballos, carnívoros, cabras, primates no humanos y humanos (Canning y Lom 1986; Mathis *et al.*, 2005). En poblaciones de conejos mascotas los rangos de seroprevalencia son altos, con 37% a 68% de animales positivos (Harcourt-Brown y Holloway, 2003).

En poblaciones de conejos silvestres el parásito es menos prevalente. Es muy probable que esto sea por la baja densidad animal (Wilson, 1979; Cox y Ross, 1980). Por otro lado, en instalaciones de bioterios se espera que el parásito sea prevalente. Pero, estas infecciones se pueden controlar con buenos estándares de higiene y estudios periódicos (Mathis *et al.*, 2005; Künzel *et al.*, 2008).

Mediante estudios genéticos y moleculares se han determinado tres cepas diferentes de *Encephalitozoon cuniculi*. Estas son denominadas: I="conejo", II="ratón" y III="perro". A pesar que los conejos son susceptibles a las tres cepas, solo se tienen reportes de conejos infectados naturalmente con la cepa

"conejo". No obstante, la distribución geográfica de estas cepas no se ha investigado sistemáticamente (Mathis, 2000; Mathis *et al.*, 2005).

Los casos confirmados de infecciones humanas han sido con las cepas "perro" y "conejo". Estos casos solo se reportaron desde 1994, pues anteriormente no se determinaba la cepa involucrada en todos los casos de infecciones por *Encephalitozoon*. Todos los casos de contagios confirmados se han descrito en pacientes inmunocomprometidos, la mayoría de ellos VIH-positivos (Mathis *et al.*, 2005), clasificando a la encefalitozoonosis como una enfermedad oportunista (Künzel y Joachim, 2010). (Tabla 1).

Cepa del <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Hospedero	Área geográfica
I ("Cepa conejo")	Conejo Humano	Suiza, Estados Unidos, Alemania, Australia, Italia, Japón. Suiza, Italia, Estados Unidos.
II ("Cepa ratón")	Ratón Rata silvestre Lobo azul	Republica Checa, Reino Unido, Estados Unidos. Suiza. Noruega, Finlandia
III ("Cepa perro")	Perro	Estados Unidos, Sudáfrica

**Tabla 1:** hospedero y distribución geográfica de las cepas del *Encephalitozoon cuniculi* (Mathis *et al.*, 2005)

## 2.7 CONTROL Y MANEJO

### 2.7.1 Diagnóstico diferencial

El principal diagnóstico diferencial para los trastornos vestibulares en conejos se debe hacer entre la encefalitozoonosis y la otitis media/interna. A diferencia de los conejos con enfermedad vestibular debido a una encefalitozoonosis, la otitis media/interna se asocia generalmente con síntomas de infección respiratoria alta (estornudos, secreción nasal, estridor) y en ocasiones con neumonía (Snyder *et al.*, 1973). Sin embargo, en la mayoría de los casos de trastorno vestibular en conejos es común que se aíse *Pasteurella multocida* de la bulla timpánica y que ambos oídos estén afectados (Kunstýr y Naumann, 1983).

Mientras que la encefalitozoonosis causa enfermedad vestibular central, la otitis media/interna típicamente causa enfermedad vestibular periférica. Sin embargo, una diferenciación entre la enfermedad vestibular central y la periférica, hecha exclusivamente en base al examen neurológico, se puede realizar solo en unos pocos casos. La radiografía de la bulla timpánica puede ser de ayuda en el diagnóstico de la otitis media. Pero, los cambios también pueden ser encontrados accidentalmente en conejos con enfermedad subclínica (Snyder *et al.*, 1973).

Las bacterias, virus y parásitos pueden ser agentes causales de enfermedades neurológicas en conejos. La meningoencefalitis, debida a infecciones bacterianas, suele detectarse con frecuencia como una causa de enfermedad neurológica en conejos (Gruber *et al.*, 2009). Por otro lado, las infecciones virales del sistema nervioso central (SNC) pueden inducir una enfermedad neurológica de baja frecuencia en conejos, como las producidas por los virus del herpes simple y el de la rabia (Weissenböck *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 1999). El acaro *Psoroptes cuniculi* puede ocasionar otitis externa, la que ocasionalmente suele asociarse con la inclinación transitoria de la cabeza (Kunstýr y Naumann, 1983).

La toxoplasmosis está entre las enfermedades parasitarias que pueden causar enfermedad neurológica en los conejos. No obstante, la infección suele ser sub-clínica y se le considera como causa poco frecuente de enfermedad neurológica en conejos. La toxoplasmosis clínica (en contraste con la encefalitozoonosis) ocasiona en conejos signos inespecíficos, como letargia, inapetencia y fiebre. El *Toxoplasma gondii* puede inducir meningoencefalitis granulomatosa similar a la observada en encefalitozoonosis, pero se puede diferenciar por la morfología del tejido y el diagnóstico serológico e inmunohistoquímico (Dubey *et al.*, 1992).

El sistema nervioso central de los conejos también se puede afectar por agentes no infecciosos. Se documenta que las lesiones neoplásicas, con mayor frecuencia linfomas, pueden involucrar el SNC. Las paresias o parálisis

en conejos son causadas generalmente por daños traumáticos, que resultan de fracturas o subluxaciones de la columna vertebral. La enfermedad degenerativa del disco intervertebral y otras condiciones, tales como la osteoartritis, problemas de articulaciones o debilidad muscular, pueden causar ataxia (Harcourt-Brown, 2004). El traumatismo craneal puede causar daño cerebral y provocar signos neurológicos. Las lesiones cardiovasculares, causas metabólicas tóxicas y lesiones degenerativas del SNC se deben considerar en el diagnóstico diferencial de los trastornos neurológicos en conejos (Gruber *et al.*, 2009).

El diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal en conejos con encefalitozoonosis se debe hacer principalmente con la nefrolitiasis. La nefrolitiasis puede ser detectada por exámenes radiográficos o ultrasonográficos y diferenciarse fácilmente de la azotemia causada por *Encephalitozoon cuniculi* (Harcourt-Brown y Harcourt-Brown, 2002; Harcourt-Brown y Holloway, 2003). Por otro lado, el diagnóstico diferencial más importante para la uveítis facoclástica, que se observa en conejos con encefalitozoonosis, se debe hacer con la uveítis bacteriana por *Pasteurella multocida*. Sin embargo, la uveítis puede ser también secundaria a queratitis o causada por un traumatismo o cuerpos extraños penetrantes (Harcourt-Brown y Harcourt-Brown, 2002).

### **2.7.2 Procedimientos diagnósticos**

El diagnóstico definitivo de la encefalitozoonosis *in vivo* es difícil. El diagnóstico se obtiene mediante la combinación de exámenes. Entre ellos, se considera de utilidad los exámenes clínico, neurológico, oftalmológico, serológico y por la exclusión de los diagnósticos diferenciales. Por lo general, cuando no se detectan anticuerpos se excluye una infección (Csokai *et al.*, 2009) y cuando se detectan, este hecho solo demuestra un contacto previo con el antígeno.

La encefalitozoonosis parece desarrollarse y extenderse lentamente y los síntomas no se desarrollan en la mayoría de los casos. En este sentido, la detección de anticuerpos específicos sólo puede confirmar un contacto previo con el patógeno y muchos conejos, a pesar de estar clínicamente sanos, muestran títulos de anticuerpos de moderados a elevados (Harcourt-Brown, 2004; Künzel *et al.*, 2008; Csokai *et al.*, 2009). Por otro lado, el diagnóstico post-mortem demuestra esporas en un gran número de animales sin síntomas de la enfermedad (Csokai *et al.*, 2009).

El análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) puede ayudar al diagnóstico clínico de la encefalitozoonosis, ya que un aumento en las concentraciones de proteína en este son signos característicos de la encefalitozoonosis en conejos. Sin embargo, cualquier otra fuente viral, protozoo o encefalitis mediada por el sistema inmune pueden inducir un resultado similar (Jass *et al.*, 2008).

#### **2.7.2.1 Serología**

La detección serológica de anticuerpos es un método de diagnóstico de gran valor en la encefalitozoonosis. La serología es la herramienta de diagnóstico disponible más sensible durante la etapa temprana de la infección (Cox y Gallichio, 1978; Csokai *et al.*, 2009). En este sentido, los anticuerpos séricos contra *Encephalitozoon cuniculi* se desarrollan dentro de las 3 semanas después de la infección, en conejos de laboratorio (Cox *et al.*, 1979). Además, la seroconversión se puede demostrar por lo menos 2 semanas antes que los organismos intracelulares sean detectados en los tejidos y 4 semanas antes de encontrar lesiones histopatológicas en el riñón o que los organismos puedan ser encontrados en la orina (Cox y Gallichio, 1978).

Las lesiones en el cerebro producidas por el *Encephalitozoon cuniculi* se pueden detectar recién mucho después de la seroconversión. Los anticuerpos séricos contra *Encephalitozoon cuniculi* se desarrollan dentro de las 3 semanas después de la infección, pero las lesiones cerebrales se observan sólo en torno a las 8 semanas después del inicio de la respuesta de

anticuerpos séricos (Cox y Gallichio, 1978). Posteriormente, los títulos de anticuerpos pueden persistir durante años, con niveles fluctuantes. Primero se mantienen altos durante varios meses y luego disminuyen ligeramente. No obstante, no se sabe si los animales excretan esporas durante los episodios de aumento de los niveles de anticuerpos (Waller *et al.*, 1978).

La serología es la herramienta más importante para el diagnóstico de la encefalitozoonosis en el animal vivo. Estudios experimentales en todo el mundo han encontrada tasas de infección altas, tanto en conejos con signos neurológicos como en animales aparentemente sanos. (Tabla 2). Por ello, varias pruebas serológicas se han desarrollado con el fin de detectar anticuerpos contra el *Encephalitozoon cuniculi* en conejos y todas han demostrado ser eficaces. Por ejemplo, las técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y ELISA son las pruebas más comunes y se correlacionan bien entre sí (Boot *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2006).

Lugar	Estado de salud	Nº animales testeados	Nº animales positivos	% animales positivos
Eslovaquia	No disponible	571	238	41.7%
Suiza	Asintomáticos	292	22	7.5%
	Signos neurológicos	72	61	84.7%
Reino Unido	Asintomáticos	38	14	36.8%
	Signos neurológicos	58	23	39.7%
	Lesiones oculares	8	8	100%
España	No disponible	22	2	9.1%

**Tabla 2:** Prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos determinado por ensayo serológico (Jordan *et al.*, 2006).

La tasa de animales con encefalitozoonosis sub-clínica es alta. Por ello, la seroconversion sólo indica infección crónica, pero no confirma al *Encephalitozoon cuniculi* como responsable de los signos de la enfermedad. Por otro lado, un resultado negativo en serología no descarta al organismo como causa de enfermedad. Por lo tanto, el diagnóstico serológico se puede utilizar para distinguir entre los dos principales agentes etiológicos posibles causantes de trastornos vestibulares en conejos. Si se encuentran animales seronegativos para *Encephalitozoon cuniculi*, hay una alta probabilidad de que la *Pasteurela multocida* sea responsable de los signos clínicos (Kunstýř y Naumann, 1983).

### 2.7.2.2 Detección de esporas en los tejidos

Los cambios histopatológicos son indicativos de encefalitozoonosis en conejos. Las esporas intracelulares pueden ser detectadas post mortem en las secciones de tejidos, sobre todo de los riñones y el cerebro (Shadduck *et al.*, 1979). La infección parece extenderse desde el tracto urinario a los órganos neurológicos. Por lo tanto, las esporas se detectan primero en los riñones, 4 semanas después de la seroconversión, seguido por el cerebro, 8 semanas después de la seroconversión (Cox y Gallichio, 1978). En conejos infectados de forma natural las esporas se puede detectar en una frecuencia ligeramente mayor en los riñones que en el cerebro (Csokai *et al.*, 2009).

La detección del organismo es difícil si se emplean métodos de tinción de rutina, debido al tamaño diminuto de las esporas. Este es el caso de la tinción con hematoxilina-eosina, la cual no resulta ser la más apropiada para el caso. Para teñir las esporas se usan métodos específicos, tales como tinción cromotrópica, Ziehl-Neelsen Modificado, inmunofluorescencia o la tinción quimiofluorescente (blanco de calcofluor, fungifluor, uvitex 2b), ya que son más sensibles (Weber *et al.*, 2000). La microscopía electrónica se considera el "estándar de oro" para la detección de esporas (Didier *et al.*, 1995). Sin embargo, esta prueba es laboriosa y (como con las tinciones quimiofluorescente o cromotrópico) no diferencia entre *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* (Didier *et al.*, 1991).

### 2.7.2.3 Detección de esporas en los fluidos corporales

El *Encephalitozoon cuniculi* puede transmitirse principalmente por las esporas excretadas con la orina. Las primeras esporas en la orina se pueden detectar de 3 a 5 semanas después de la seroconversión (Cox y Gallichio, 1978). Pero, la excreción disminuye durante los siguientes meses (Cox *et al.*, 1979). Los métodos de tinción específicos (tinción cromotrópica y quimiofluorescente) son más sensibles que las técnicas estándar (Didier *et al.*,



1995). Dado que la excreción de esporas en la orina se lleva a cabo de forma esporádica, un resultado negativo no excluye la infección (Cox *et al.*, 1979; Csokai *et al.*, 2009). La excreción por las heces no se puede demostrar con regularidad (Harcourt-Brown y Holloway, 2003).

#### **2.7.2.4 Análisis moleculares**

Las pruebas moleculares se vienen utilizando desde varios años para lograr la confirmación rápida y precisa de la enfermedad. El uso de la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmar la encefalitozoonosis en conejo ha sido empleada en múltiples experimentos (Csokai *et al.*, 2009). Sin embargo, tanto las muestras de orina y líquido cefalorraquídeo analizados con PCR han resultado poco fiables para la detección de *Encephalitozoon cuniculi*, ya sea en pacientes subclínicos o aquellos que muestran signos manifiestos de la enfermedad (Kunzel *et al.*, 2008).

Las pruebas de PCR pueden tener buenos resultados si se utiliza el material biológico apropiado. La prueba de PCR, que utiliza material del cristalino facoemulsificado de conejos con uveítis facoclástica, ha demostrado resultados satisfactorios, pues se obtiene el 100% de resultados positivos. Esto es debido, muy probablemente, a una mayor concentración de esporas en el material del cristalino, que en los órganos o líquidos corporales. (Künzel *et al.*, 2008; Csokai *et al.*, 2009).

### **2.8 TERAPIA Y CONTROL**

Las medidas terapéuticas y de control dependen de la manifestación clínica de la infección. Consecuentemente, no existe un protocolo estándar para el tratamiento de conejos con una probable infección por *Encephalitozoon cuniculi*. Hasta la fecha no existe un protocolo aprobado para el tratamiento de conejos con encefalitozoonosis. No obstante, algunos estudios de la enfermedad vestibular en conejos han demostrado que el tratamiento con

glucocorticoides, en combinación con enrofloxacin, oxitetraciclina o fenbendazol, resulta en una tasa de recuperación inicial de 50%. Sin embargo, resulta difícil evaluar la eficacia de los protocolos de tratamiento (Harcourt - Brown y Holloway, 2003; Künzel *et al.*, 2008).

La sensibilidad del *Encephalitozoon cuniculi* a los medicamentos ha sido evaluada experimentalmente *in vitro*. Los estudios demostraron que los medicamentos más eficaces son los antibióticos: fumagilina y la oxitetraciclina y los antihelmínticos: albendazol, oxibendazol y tiabendazol (Waller, 1979; Shadduck, 1980; Beauvais *et al.*, 1994; Franssen *et al.*, 1995). En este sentido, el albendazol es considerado como el fármaco más eficaz contra microsporidiosis en humanos (Beauvais *et al.*, 1994). Pero, a pesar de tener un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la enfermedad y ser bien tolerado por los conejos, tiene efectos adversos, pues es embriotóxico y teratogénico.

El uso del fenbendazol en conejos también ha demostrado ser útil para prevenir y tratar las infecciones por *Encephalitozoon cuniculi*. Los conejos infectados experimentalmente y luego tratados con fenbendazol no hacen seroconversión, ni se pueden aislar esporas del tejido cerebral. Por otro lado, en conejos con infección natural y tratados con fenbendazol durante 4 semanas no se puede aislar el organismo a partir de tejido cerebral. Debido a estos hallazgos, el fenbendazol por vía oral, a una dosis de 20 mg/kg/día durante 28 días, se considera el fármaco de elección para el tratamiento de la encefalitozoonosis en conejos (Suter *et al.*, 2001).

Los dos medicamentos probados para tratar la encefalitozoonosis en conejos y que han tenido éxito son antihelmínticos. El albendazol y el fenbendazol son derivados bencimidazólicos con amplia actividad antihelmíntica. El objetivo de los bencimidazoles es la subunidad beta de la tubulina. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la división de los microsporidiosis al bloquear la síntesis de tubulina, que tiene una participación esencial en la división celular y es el constituyente principal del citoesqueleto (Costa y Weiss, 2000; Anane y Attouchi, 2010).

Los signos neurológicos asociados a la encefalitozoonosis se deben a una reacción inflamatoria. La multiplicación de los organismos ocasiona la ruptura de las células del cerebro, lo que genera una fuerte reacción inflamatoria (Feaga, 1997). Por ello, al igual que el tratamiento de la meningoencefalitis granulomatosa en otros animales, los corticosteroides se usan para reducir la reacción inflamatoria. Sin embargo, el tratamiento anti-inflamatorio con corticosteroides se considera polémico, debido a que tiene efectos inmunosupresores. Los corticosteroides pueden afectar los mecanismos de defensa contra la encefalitozoonosis. Se cree que el principal mecanismo de la lucha contra el *Encephalitozoon cuniculi* lo tienen la función reguladora de los linfocitos T y las citoquinas derivadas ellos. Las dosis inmunosupresoras de los corticosteroides pueden afectar este mecanismo de defensa. Por lo tanto, el uso de glucocorticoides, con el fin de mejorar el tratamiento clínico de la encefalitis causada por *Encephalitozoon cuniculi*, tiene que ser evaluado con mayor detalle en estudios controlados (Horváth *et al.*, 1998).

Se recomienda incluir la terapia contra la encefalitozoonosis en el protocolo de tratamiento inicial para cualquier conejo que muestre signos vestibulares (Harcourt-Brown, 2004). El diagnóstico diferencial más importante para los conejos con signos vestibulares es con la otitis media/interna. Por tal motivo, algunos autores recomiendan una terapia adicional con antibióticos (Kunstýr y Naumann, 1983). La extirpación quirúrgica del cristalino por facoemulsificación, junto con el tratamiento médico, ha demostrado ser un tratamiento exitoso para los conejos con uveítis facoclastica (Stiles *et al.*, 1997). Por lo tanto, el retiro inmediato del cristalino es el tratamiento de elección para esta condición. Cuanto más rápido se realice la cirugía mejor será el resultado clínico. En los casos crónicos de endoftalmitis se recomienda la enucleación del ojo afectado.

Los conejos que resulten seropositivos se deben eliminar de los laboratorios o colonias de conejos, con el fin de evitar la propagación de la infección, ya que los conejos seropositivos pueden eliminar esporas. Un programa de erradicación completa debe incluir la desinfección de las

instalaciones de los animales, jaulas y equipos (Waller, 1979). Las esporas del *Encephalitozoon cuniculi* pueden ser eliminadas mediante tratamientos físicos o químicos. Las esporas son eliminadas cuando se hierven durante 5 minutos o son tratadas en autoclave a 120 °C durante 10 minutos. Por otro lado, se inactivan cuando se les somete durante 30 minutos a la acción de: etanol al 70 %, formaldehído al 0,3 %, hidróxido de sodio al 1 % y peróxido de hidrógeno al 1% (Waller, 1979).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. LUGAR Y TIEMPO DEL ESTUDIO**

Para el estudio se recolectaron muestras de sangre de conejos de 7 granjas de distintos lugares de la provincia de Lima entre los meses de agosto del 2010 y agosto del 2011. La toma de muestra se limitó a los animales que nos permitieron manipular y a los que estuvieran clínicamente sanos.

Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron rotuladas y remitidas inmediatamente Laboratorio de Microbiología y Parasitología - Sección Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde fueron centrifugadas para la extracción del suero y posteriormente congelado para su procesamiento, utilizando un kit comercial de ELISA suministrado por Medicago AB (Medicago AB, Uppsala, Suecia) para detección de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*.

## **3.2. METODOLOGIA DE TRABAJO**

### **3.2.1. Obtención de muestras**

Se obtuvieron 2ml de sangre en frascos sin anticoagulante de 76 conejos mediante punción de la vena auricular utilizando agujas 23G x 1". Para la extracción de las muestras se premedico previamente a los conejos con acepromazina maleato (1mg/kg) y tramadol (10 mg/kg) por inyección intramuscular para tranquilización y manejo de dolor respectivamente. La premedicación, sujeción y extracción de las muestras fueron realizadas por un médico veterinario.

### **3.2.2. Procesamiento de las muestras**

Se obtuvieron datos de la edad, sexo, raza y lugar de procedencia de la muestra y luego fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología y Parasitología - Sección Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde fueron centrifugadas a 2500 revoluciones por minuto durante 10 minutos para la extracción del suero y posteriormente congelado a -20 °C hasta su procesamiento, utilizando un kit comercial de ELISA para detección de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*,

## **3.3 ANALISIS ESTADISTICO**

La prevalencia se calculará empleando una distribución beta utilizando el programa @Risk (Palisade Corp.) implementado en una planilla electrónica Excel (Microsoft Corp.) En este caso para los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  de la distribución beta se consideró  $\alpha = positivos + 1$  y el parámetro  $\beta = negativos + 1$ . Los parámetros se consideraron en una simulación que se corrió con 30,000 interacciones para calcular intervalos de confianza del 95%.

Para evaluar las variables que afectaron la prevalencia se empleó una regresión logística. El nivel de significancia para la regresión fue de 0.05.

#### IV. RESULTADOS

De las 76 muestras analizadas se encontró que el 43 muestras (56.6%) resultaron positivas y 33 muestras (43.4%) fueron negativas a la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi*. La prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi* fue de 56% (45% - 67%) como se aprecia en la figura 8:

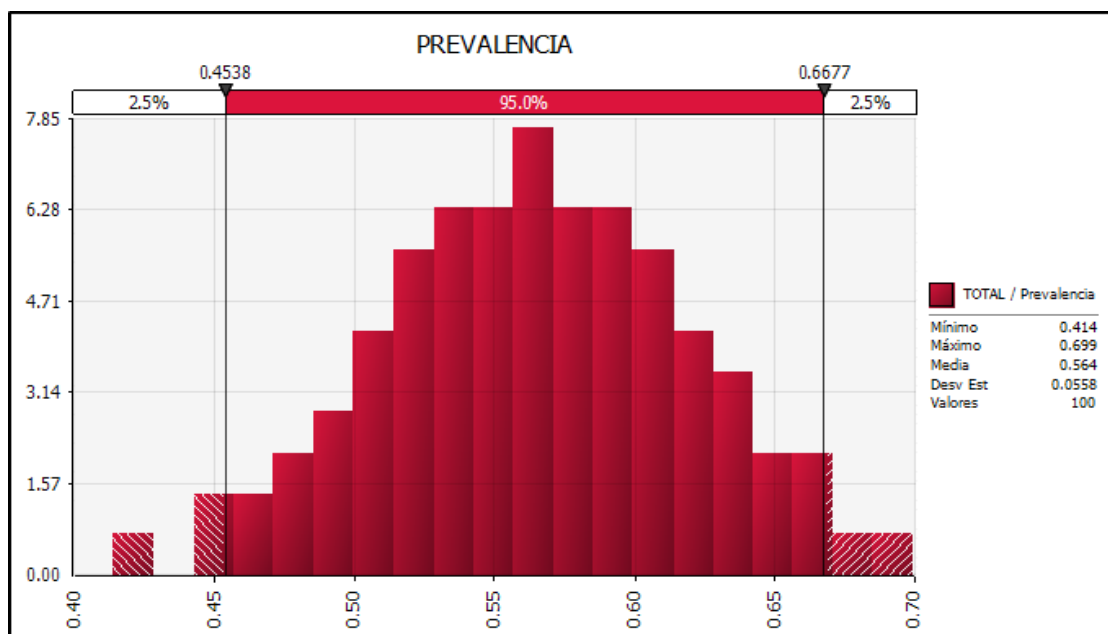


Figura 8: Prevalencia de *Encephalitozoon cuniculi*.



Según la regresión logística, la edad en meses (9 meses) se asociaba al riesgo que un conejo sea positivo a la prueba serológica ( $P < 0.05$ ). La tabla 3 detalla los valores encontrados en la regresión.

Logistic regression	Number of obs	63
	LR chi2(13) =	7.41
	Prob > chi2 =	0.8801
Log likelihood = -39.957698	Pseudo R2	0.0848

---

estado	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
sexo	.6881744	.4163853	-0.62	0.537	.2102192 2.252811
lraza_2	.8298955	1.22185	-0.13	0.899	.0463239 14.86764
lraza_3	1.082749	1.472796	0.06	0.953	.0752821 15.5727
_lmeses_7	.4263457	.8927806	-0.41	0.684	.0070359 25.8347
_lmeses_8	1.007167	2.451201	0.00	0.998	.0085405 118.7735
_lmeses_9	5.09e-09	4.71e-09	-20.66	0.000	8.33e-10 3.12e-08
_lmeses_12	5.518643	11.74159	0.80	0.422	.0852701 357.1643
_llugar_1	.5350659	1.216953	-0.27	0.783	.0062006 46.17193
_llugar_2	.6191375	1.507633	-0.20	0.844	.0052368 73.19954
_llugar_3	3.637494	9.158244	0.51	0.608	.0261639 505.7101
_llugar_4	.4263457	.8927806	-0.41	0.684	.0070359 25.8347
_llugar_5	5.88e+08	.	.	.	.
_llugar_6	.4353729	1.067362	-0.34	0.734	.0035649 53.1706

**Tabla 3:** Valores de regresión logística.

A continuación la tabla 4 muestra la frecuencia de animales positivos según sexo y edad:

DATOS DEL CONEJO	Nº ANIMALES TESTEADOS	Nº ANIMALES POSITIVOS	% POSITIVOS
------------------	-----------------------	-----------------------	-------------

SEXO			
Machos	46	26	56.5
Hembras	30	17	56.7
EDAD			
6 Meses	16	6	37.5
7 Meses	9	5	55.6
8 Meses	6	4	66.7
9 Meses	9	5	55.6
12 Meses	36	23	63.9
TOTAL	76	43	56.6

**Tabla 4:** Frecuencia de animales positivos según sexo y edad

Las siguientes tablas (tablas 5 y 6) muestran los resultados por raza y lugar de procedencia:

RAZA	Nº ANIMALES TESTEADOS	Nº ANIMALES POSITIVOS	% POSITIVOS
Angora	1	0	0.0
Azul de berveren	1	1	100.0
Borgoña rex	1	1	100.0
Cabeza de león	10	5	50.0
California	30	14	46.7
Cruzado	23	13	55.6
Leonado de borgoña	1	1	100.0
Loop aleonado	2	2	100.0
Mariposa	1	0	0.0
Nueva Zelanda	2	2	100.0
Rex	4	4	100.0
TOTAL	76	43	56.6

**Tabla 5:** Frecuencia de animales positivos según raza

LUGAR DE PROCEDENCIA	Nº ANIMALES TESTEADOS	Nº ANIMALES POSITIVOS	% POSITIVOS
GRANJA 1	16	6	37.5
GRANJA 2	10	4	40.0
GRANJA 3	8	6	75.0
GRANJA 4	10	6	60.0
GRANJA 5	10	8	80.0

GRANJA 6	8	5	62.5
GRANJA 7	14	8	57.1
TOTAL	76	43	56.6

**Tabla 6:** Frecuencia de animales positivos según lugar de procedencia

## V. DISCUSION

Desde hace muchos años se reconoce el papel del *Encephalitozoon cuniculi* como agente de enfermedad clínica en conejos de laboratorio. Pero, sólo recientemente ha sido reportado como un problema importante en conejos destinados como mascota (Harcourt-Brown y Holloway, 2003), así como se ha establecido su potencial zoonótico en pacientes inmunodeprimidos, como pacientes VIH positivos, receptores de transplantes y otros pacientes inmunocomprometidos (Fournier *et al.*, 2000). Por ello, es necesario hacer estudios epidemiológicos, para tener datos actualizados (“foto del momento”) de la situación de la enfermedad en conejos mascota.

Los resultados del presente trabajo determinaron la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* en el 56.6% (n=76) de las muestras tomadas de conejos clínicamente sanos, destinados como mascotas en Lima Metropolitana. Este hallazgo confirma la información de que la prevalencia del *Encephalitozoon cuniculi* generalmente es elevada en conejos de bioterios y en conejos destinados como mascota, debido a la gran densidad de animales (Harcourt-Brown y Holloway, 2003). Por el contrario, la prevalencia es baja en poblaciones de conejos silvestres, probablemente por la baja densidad animal (Wilson, 1979; Cox y Ross, 1980).

Al analizar este resultado debemos tomar en cuenta el hecho que es muy difícil diferenciar entre conejos con infección activa o infección latente (Dipineto *et al.*, 2008). Muchos conejos, a pesar de estar clínicamente sanos, muestran títulos de anticuerpos de moderados a elevados y se puede encontrar esporas en el examen post-mortem en un gran número de animales sin síntomas de la enfermedad (Csokai *et al.*, 2009). Esto confirma que la importancia del hallazgo de un elevado porcentaje de conejos seropositivos no está muy clara, ya que la respuesta positiva a la presencia de anticuerpos solo indica exposición al microsporidio, mas no predice el progreso la infección.

Un resultado serológico positivo no confirma al *Encephalitozoon cuniculi* como responsable de la enfermedad clínica, ni un resultado negativo descarta al organismo como causa de enfermedad. Sin embargo, en animales jóvenes con signos neurológicos un solo resultado negativo descarta al *Encephalitozoon cuniculi* como causa de enfermedad clínica, ya que el parásito demora entre 8 a 10 semanas para llegar al SNC (Csokai *et al.*, 2009). Pero, si se detectan, solo demuestran un contacto previo con el microsporidio. También hay que tener en cuenta que un conejo asintomático seropositivo puede desarrollar la enfermedad o mantenerse como portador asintomático. Por ello, para diferenciar entre estas posibilidades se tendría que medir títulos de anticuerpos durante un período de tiempo, para demostrar cambios en sus niveles (Keeble y Shaw, 2006).

El análisis de los resultados del presente estudio encontró que existe diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre la presencia de anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* y la variables edad (9 meses). Estos resultados no coinciden con los encontrados por Keeble y Shaw (2006), quienes no encontraron diferencias en cuanto a edad, raza, sexo y estado de salud. Tal vez debido a que los microsporidios pueden afectar a cualquier animal de una explotación (cuya densidad poblacional sea alta) y aunque son ubicuos, gracias a su gran capacidad de contaminar el medio ambiente, ya que muchos conejos son portadores asintomáticos. Además, está el hecho que las esporas son capaces de infectar a otros mamíferos, incluyendo roedores,

lobos, caballos, carnívoros, cabras, primates no humanos y humanos (Canning y Lom 1986; Mathis *et al.*, 2005), que luego eliminarán esporas.

Otros estudios realizados (Dipineto *et al.*, 2008) encontraron diferencia significativa con respecto a la variable edad. De hecho los conejos adultos tuvieron una predisposición mayor para la infección por *Encephalitozoon cuniculi* que los conejos más jóvenes, que se explica teniendo en cuenta que los anticuerpos maternos pasan a la descendencia y están presentes hasta las 4 semanas de edad (Lyngset 1980), que de las 4 a 8 semanas de edad los animales son seronegativos y que la mayoría de sus animales estudiados tenían de 2 meses a más de edad.

Desde que la cepa de *Encephalitozoon* involucrada en una infección se puede determinar por métodos moleculares, todos los casos confirmados de humanos han sido debidos a las cepas "perro" y "conejo". De igual manera, todos los casos de contagios confirmados se han descrito en pacientes inmunocomprometidos, la mayoría de ellos VIH-positivos (Mathis *et al.*, 2005), clasificando a la encefalitozoonosis como una enfermedad oportunista (Künzel y Joachim, 2010).

El alto porcentaje de conejos seropositivos demuestra que los análisis para la detección de anticuerpos anti-*Encephalitozoon cuniculi* en conejos son necesarios, sobre todo, para conejos cuyos dueños presentan un riesgo elevado de contraer la infección y desarrollar la enfermedad, como pacientes con SIDA, niños y ancianos. Los numerosos hallazgos, en Europa y los EEUU, de infecciones por *Encephalitozoon cuniculi* (determinados por métodos serológicos y moleculares) en pacientes infectados con VIH, receptores de transplantes o con linfocitopenia idiopática, prueban la infectividad del *Encephalitozoon cuniculi* para los seres humanos inmunodeficientes (Mathis *et al.*, 2005).

## **V. CONCLUSIÓN**

Se determinó la presencia del *Encephalitozoon cuniculi* y se encontró una prevalencia alta (56.6%) en conejos destinados como mascota en la provincia de Lima.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Anane S, Attouchi H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol*. 34(8-9):450-64.
2. Arguelles JC. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol*. 174(4):217– 24.
3. Beauvais B, Sarfati C, Challier S, Derouin F. 1994. In vitro model to assess effect of antimicrobial agents on *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrob Agent Chemother*. 38(10):2440–8.
4. Biderre C, Mathis A, Deplazes P, Weber R, Metenier G, Vivares CP. 1999. Molecular karyotype diversity in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitology* 118(5): 439–45.
5. Bigliardi E, Sacchi L. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect*. 3(5):373-9.



6. Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, Sacchi L. 1996. Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. J Eukaryot Microbiol. 43 (3):181–6.
7. Boot R, Hansen AK, Hansen AK, Nozari N, Thuis HC. 2000. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. Lab Anim. 34(3):281–9.
8. Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. 1993. *Septata intestinalis* n. g., n. sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J. Eukaryot. Microbiol. 40 (1):101–12.
9. Canning EU, Lom J. 1986. The Microsporidia of vertebrates. Academic Press London. 289p.
10. Cavalier-Smith T. 2004. Only six kingdoms of life. Proc Biol Sci. 271(1545):1251–62.
11. Clark D. 2010. Molecular biology. ELSEVIER USA. 783p.
12. Costa SF, Weiss LM. 2000. Drug treatment of microsporidiosis. Drug Resist Updat; 3:384—99.
13. Cox JC, Gallichio HA. 1978. Serological and histological studies on adult rabbits with recent, naturally acquired encephalitozoonosis. Res Vet Sci 24(2):260–261.
14. Cox JC, Hamilton RC, Attwood HD. 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. J Protozool. 26(2):260–5.
15. Cox JC, Ross J. 1980. A serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in the wild rabbit in England and Scotland. Res Vet Sci. 28(3):396.

16. Csokai J, Gruber A, Künzel F, Tichy A, Joachim A. 2009. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol Res.* 104(3):629–35.
17. Didier ES. 1998. STATE-OF-THE-ART CLINICAL ARTICLE Microsporidiosis. *CID.* 27:1-7.
18. Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection.* 2(6):709-20.
19. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol.* 33(12):3138–45.
20. Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol.* 126(1-2): 145-66.
21. Didier PJ, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. 1991. Fine structure of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, in culture. *J Protozool.* 38(5):502–7.
22. De Graaf DC, Masschelein G, Vandergeynst F, De Brabander HF, Jacobs FJ. 1993. In vitro germination of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) spores and its effect on their  $\alpha$ -trehalose/d-glucose ratio. *J Invert Pathol.* 62(3):220–25.
23. Dipineto L, Rinaldi L, Santaniello A, Sensale M, Cuomo A, Calabria M, Menna LF, Fioretti A. 2008. Serological Survey for Antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in Pet Rabbits in Italy. *Zoonoses and Public.* 55(3):173-5.

24. Dubey JP, Brown CA, Carpenter JL, Moore JJ. 1992. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. *Vet Parasitol.* 44(3-4):305–9.
25. Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK. 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol.* 5(2):359–67.
26. Feaga WP. 1997. Wry neck in rabbits. *J Am Vet Med Assoc.* 210(4):480.
27. Franssen FF, Lumeij JT, van Knapen F. 1995. Susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* to several drugs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(6):1265–8.
28. Franzen C. 2004. Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol.* 20(6): 275-9.
29. Franzen C, Müller A. 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes Infect.* 3(5):389–400.
30. Fournier S, Liguory O, Sarfati C, David-Ouaknine F, Derouin F, Decazes JM, Molina JM. 2000. Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: case report and review. *HIV Med.* 1(3):155-61.
31. Frixione E, Ruiz L, Cerbon J, Undeen AH. 1997. Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: Conditional inhibition by D<sub>2</sub>O, ethanol and Hg<sup>2+</sup> suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J Eukaryot Microbiol.* 44(2):109–16.
32. Germot A, Philippe H, Le Guyader H. 1997. Evidence for loss of mitochondria in microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol.* 87(2):159–68.

33. Gruber A, Pakozdy A, Weissenböck H, Csokai J, Künzel F. 2009. A retrospective study of neurological disease in 118 rabbits. *J Comp Pathol.* 140(1):31–7.
34. Harcourt-Brown FM, Harcourt-Brown NH. 2002. Textbook of rabbit medicine. Butterworth-Heinemann, Oxford, Boston. 410p.
35. Harcourt-Brown FM, Holloway HK. 2003. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. *Vet Rec.* 152(14):427-31.
36. Harcourt-Brown FM. 2004. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits., *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 13(2):86-93.
37. Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM. 1997. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol.* 7(12):995–8.
38. Horváth M, Svicky E, Sevcikova Z. 1998. Pathomorphological response to *Encephalitozoon cuniculi* infection in cyclophosphamide-treated rabbits. *Acta Vet (Brno)* 67:37–42.
39. Jass A, Matiassek K, Henke J, Küchenhoff H, Hartmann K, Fischer A. 2008. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet Rec.* 162(19):618–22.
40. Jordan CN, Zajac AM, Lindsay DS. 2006. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *Comp Cont Educ Pract.* 28:108-16.
41. Karp BE, Ball NE, Scott CR, Walcoff JB. 1999. Rabies in two privately owned domestic rabbits. *J Am Vet Med Assoc.* 215(12):1824–7.

42. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, El Alaoui H, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarès CP. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414(6862):450–3.
43. Keeble EJ, Shaw DJ. 2006. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet Rec.* 158(16):539–44.
44. Kelling PJ, Fast NM. 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Microbiol.* 56:93-116.
45. Keohane EM, Weiss LM. 1998. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol.* 45(2):117–27.
46. Koudela B, Kucerová S, Hudcovic T. 1999. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol (Praha).* 46(3):171–4.
47. Kunstýr I, Naumann S. 1983. Head tilt in rabbits caused by *Pasteurella* and encephalitozoonosis. *Lab Anim.* 19(3):208-13.
48. Künzel F, Gruber A, Tichy A, Edelhofer R, Nell B, Hassan J, Leschnik M, Thalhammer JG, Joachim A. 2008. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol.* 151(2-4):115–24.
49. Künzel F, Joachim A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res.* 106(2):299-309.
50. Li X, Palmer R, Trout JM, Fayer R. 2003. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *J Parasitol.* 89(1):185–8.

51. Lyngset A. 1980. A survey of serum antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in breeding rabbits and their young. *Lab Anim Sci.* 30(3):558-61.
52. Lom J, Vavra J. 1963. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool.* 1:81–92.
53. Mathis A. 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol.* 30(7):795–804.
54. Mathis A, Weber R, Deplazes P. 2005. Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clin Microbiol Rev.* 18(3):423-45.
55. Nast R, Middleton DM, Wheler CL. 1996. Generalized encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. *Can Vet J.* 37(5):303–5.
56. Redrobe S: Urogenital system and disorders, in Flecknell PA (ed): British Small Animal Veterinary Association: Manual of Rabbit Medicine and Surgery. Quedgeley, BSAVA, 2000, p 54.
57. Richardson VCG. 2000. The head and neck. *Rabbits: Health, Husbandry and Diseases.* Oxford, UK, Blackwell Science. 188p.
58. Shadduck JA, Polley MB. 1978. Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool.* 25(4): 491–6.
59. Shadduck JA, Watson WT, Pakes SP, Cali A. 1979. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol.* 65(1):123–9.
60. Shadduck JA. 1980. Effect of fumagillin on in vitro multiplication of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Protozool* 27(2):202–8.

61. Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. 1998. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci.* 48(6):589–92.
62. Snyder SB, Fox JG, Soave OA. 1973. Sub-clinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim Sci.* 23(2):270–2.
63. Sorvillo F, Kerndt P. 1995. Pathogenicity of the microsporidia. *AIDS* 9(2):215.
64. Sprague V, Becnel JJ, Hazard EI. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit Rev Microbiol.* 18(5-6) 285–395.
65. Stiles J, Didier E, Ritchie B, Greenacre C, Willis M, Martin C. 1997. *Encephalitozoon cuniculi* in the lens of a rabbit with phacoclastic uveitis: confirmation and treatment. *Vet Comp Ophthalmol.* 7:233–8.
66. Suter C, Müller-Doblies UU, Hatt JM, Deplazes P. 2001. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Vet Rec.* 148(15):478–80.
67. Undeen AH, Epsky ND. 1990. In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae) spores. *J Invertebr Pathol.* 56:371–9.
68. Undeen AH, Frixione E. 1990. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J Protozool.* 37(6): 561–7.
69. Undeen AH, Elgazzar LM, Vander Meer RK, Narang S. 1987. Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae). *J Invertebr Pathol.* 50:230–7.

70. Undeen AH, Vander Meer RK. 1994. Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: a quantitative study. J Eukaryot Microbiol. 41:129–32.
71. Vivarès CP, Méténier G. 2001. The microsporidian *Encephalitozoon*. BioEssays 23(2):194-202.
72. Vivarès CP, Gouy M, Thomarat F, Méténier G. 2002. Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. Curr Opin Microbiol. 5(5):499–505.
73. Waller T, Morein B, Fabiansson E. 1978. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. Lab Anim 12(3):145–8.
74. Waller T. 1979. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. Lab. Anim. 13(3), 227–30.
75. Weidner E, Canning EU, Rutledge CR, Meek CL. 1999. Mosquito (Diptera: Culicidae) host compatibility and vector competency for the human myositic parasite *Trachipleistophora hominis* (Phylum Microspora). J Med Entomol. 36(4):522-5.
76. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. 1994. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Rev. 7(49):426-61.
77. Weber R, Deplazes P, Schwartz D. 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. Contrib Microbiol. 6:166-92.
78. Weiss LM. 2001. Microsporidia: Emerging pathogenic protists. Acta Trop. 78(2):89–102.



79. Weiss LM, Edlind TD, Vossbrinck CR, Hasshimoto T. 1999. Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J Eukaryot Microbiol.* 46(5): 17S-18S.
80. Weissenböck H, Hainfellner JA, Berger J, Kasper I, Budka H. 1997. Naturally occurring herpes simplex encephalitis in domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Pathol.* 34(1):44– 7.
81. Wilson JM. 1979. *Encephalitozoon cuniculi* in wild European rabbits and a fox. *Res Vet Sci.* 26(1):114.
82. Wolfer J, Grahn B, Wilcock B, Percy D. Phacoclastic uveitis in the rabbit. 1993. *Prog Vet Comp Ophthalmol.* 3:92–7.